

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DANMARK



(51) Int. Cl. C 08 b 19/08

(45) PATENT MEDDELT

17 FEB. 1975

(21) Ansøgning nr. 2183/68 (22) Indleveret den 9. maj 1968

(23) Løbedag 9. maj 1968

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggeskriftet offentliggjort den 30. sep. 1974

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(30) Prioritet begæret fra den 29. apr. 1968 nr.
22278/67, Storbritannien.

(71) Fisons Pharmaceuticals Limited, 12 Derby Road, Loughborough, Leicestershire, Storbritannien.

(72) Opfinder: Ranulph Michael Alsop, 7 Eaton Drive, Alderley Edge, Cheshire, Storbritannien, Ian Bremner, 4 Primrose Hill Road, Cults, Aberdeen, sammesteds.

(74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Internationalt Patent-Bureau.

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af et ferrihydroxid-dextranderivatkompleks eller en opløsning deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af et ferrihydroxid-dextranderivatkompleks eller en opløsning deraf, ved omsætning af et dextranderivat med kolloid ferrihydroxid ved forhøjet temperatur.

Det er kendt, at ferrihydroxid-kulhydratkomplekser kan anvendes ved behandlingen af jernmangelanæmi. Således har et ferrihydroxiddextrankompleks i vandig opløsning vist sig at være særligt hensigtsmæssigt ved behandlingen af jernmangelanæmi, både når det indgives ad intramuskulær og ad intravenøs vej.

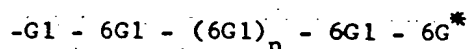
Fra USA patentskrift nr. 3.151.107 kendes en fremgangsmåde til fremstilling af et jern-carboxymethyldextran-kompleks ved reaktion mellem en vandig alkalisk opløsning af ferrichlorid og en vandig opløsning af et nærmere defineret carboxymethyldextran. Det ved fremgangsmåden opnåede produkt angives at være et vandopløseligt frit-flydende pulver. Af den nævnte patentbeskrivelse fremgår det, at

THIS PAGE BLANK (USPTO)

produktet ved lav substitutionsgrad, d.v.s. lavt antal carboxymethylethergrupper pr. anhydroglucose-enhed, kun er delvist opløseligt.

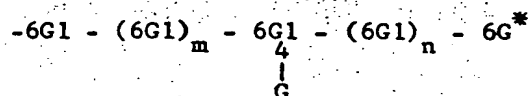
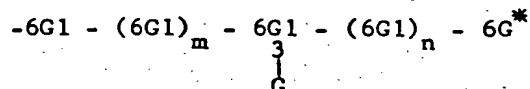
Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at et hidtil ukendt, modificeret dextran eller dextranderivat danner komplekser med ferrihydroxid. I dette dextranderivat er substitutionsgraden nul, og produktet er dog fuldstændigt vandopløseligt.

Dextran er polymeriseret glucose, hvor anhydroglucoseenhederne er bundet til hinanden overvejende med α -1:6 bindinger. Disse kæder af anhydroglucoseenheder kan bære et lille antal sidekæder med anhydroglucoseenheder, som er bundet til kæden med α -1:4 eller α -1:3 bindinger. Således kan lineær dextran, d.v.s. dextran, hvor alle anhydroglucoseenhederne er bundet med α -1:6 bindinger, repræsenteres ved formlen:



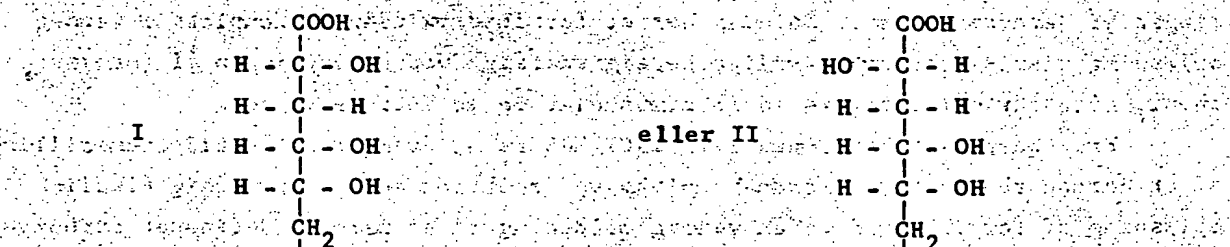
Hvor G repræsenterer en anhydroglucoseenhed, og G^* repræsenterer den endestillede reducerende anhydroglucoseenhed.

Hvis dextranen er ikke-lineær, d.v.s. indeholder en del α -1:4 eller α -1:3 bundne grene, er forgreningerne bundet til kæden, som vist i det følgende:



Det har nu vist sig, at dextran kan modificeres ved behandling med en base til frembringelse af et hidtil ukendt dextranderivat, som med ferrihydroxid danner ferrihydroxid-dextranderivatkomplekser.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er således ejendommelig ved, at der anvendes et dextranderivat, hvor de polymere kæder har mindst én endestillet enhed med strukturformlen:



eller et salt eller en lakton deraf, afledet af en dextran, hvis gennemsnitsmole-

kylvægt efter vægt er højst 50.000, hv refter det dannede kompleks eventuelt udvindes.

Produktet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen udmærker sig i forhold til det omtalte kendte produkt desuden ved en overraskende lav toxicitet.

Hvorvidt et specielt dextranderivat besidder den i det foregående skitserede struktur, kan let bestemmes ved nedbrydning af molekylet til dets bestanddele ved sur hydrolyse og bestemmelse af disse bestanddeles natur. For eksempel kan det hydrolyserede stof sendes gennem en anionbytterharpiks, som tilbageholder enhver tilstedeværende sur fraktion, og det tilbageholdte stof kan genvindes, og ved sammenligning af dets smeltepunkt med smeltepunktet for en kendt prøve af metasaccharinsyre eller dens lakton kan det vises, at det virkelig har den i det foregående nævnte struktur. Den endestillede enheds identitet kan også vises ved chromatografi. En typisk prøverutine ved en sådan strukturbestemmelse ser ud som følger. Prøven hydrolyseres først med fortyndet svovlsyre, og reaktionsblandingen neutraliseres med bariumcarbonat. Bariumsulfatbundfaldet filtreres fra, og filtratet sendes gennem en anionbytterharpiks, såsom en DEAE-cellulosesøjle. Søjlen elueres så med eddikesyre, eluatet koncentrerer, og det opløste stof udvindes. Stoffet kan derpå identificeres som metasaccharinsyre eller dens lakton ved almindelig smeltepunktsbestemmelse eller ved chromatografi.

Dextranderivaterne, der anvendes ifølge opfindelsen, kan fremstilles udfra dextran, især udfra partielt depolymeriseret dextran med lav molekylvægt, ved behandling af dextranet med en base, såsom et ammonium- eller alkalimetahydroxid eller -carbonat, fortrinsvis natriumhydroxid.

Ved fremgangsmåden anvendes dextran med en gennemsnitsmolekylvægt efter vægt på fra 500 til 50.000, fortrinsvis fra 1.000 til 10.000. Sådant dextran kan fremstilles udfra naturligt dextran, som fås ved kontrolleret forgæring af sucrose med *Leuconostoc mesenteroides*, ved hydrolyse af naturligt dextran og fraktionering af den hydrolyserede produkt.

Behandlingen af dextran med base kan udføres ved forhøjet temperatur, f.eks. ved en temperatur på fra 40 til 80°C. Ved en foretrukken fremgangsmåde udføres behandlingen ved opvarmning af en basisk opløsning af dextranet med pH 8 eller mere og tilsætning af mere base under varmebehandlingen, indtil der i hovedsagen ikke optages mere base af opløsningen.

Dextranderivatet kan adskilles fra reaktionsblandingen for eksempel ved bundfældning med et andet opløsningsmiddel.

Passende opløsningsmidler til bundfældning omfatter alkoholer med 1-6 carbon-atomer, såsom methanol, ethanol eller isopropanol, og ketoner, såsom acetone eller methylethylketon. Reaktionsblandingen kan også dialyseres mod rindende vand til fjernelse af stoffer med lav molekylvægt og uorganiske stoffer fra dextran-

derivatet, som derpå kan bundfældes som beskrevet i det foregående, hvis det kræves. Det foretrækkes sædvanligvis at neutralisere ethvert overskud af base med syre, før dextranderivatet adskilles fra reaktionsblandingen.

Hvis der ønskes et renere produkt, kan en eller flere af de i det foregående nævnte fremgangsmåder gentages. Ikke sure polymere stoffer kan også fjernes ved, at man sender en opløsning af dextranderivatet gennem en søjle med anionbytterharpiks, som tilbageholder det ønskede stof og tillader neutrale stoffer at gå igennem. Det ønskede, rensede dextranprodukt kan udvindes af søjlen ved, at man eluerer med en saltopløsning, for eksempel kaliumacetat.

Det produkt, der fremkommer ved den i det foregående skitserede fremgangsmåde, vil sædvanligvis indeholde et salt af dextranderivatet. Det frie derivat kan fås ved at uddrive syren af dette salt. Hvor der ønskes fremstillet andre salte end det dannede, kan sådanne salte fremstilles ved neutralisation af det frie dextranderivat med en egnet base, for eksempel et alkalimetal-, et jordalkalimetalt- eller et ammoniumhydroxid eller -carbonat.

Komplekserne fremstilles ifølge opfindelsen ved reaktion mellem dextranderivatet eller saltet deraf og kolloidt ferrihydroxid, som kan være blevet helt eller delvis dannet in situ i nærværelse af dextranderivatet. Det kan også være blevet dannet forud, som i tilfældet med dialyseret ferrihydroxid. Det kolloide ferrihydroxid fremstilles i almindelighed ved en dobbelt dekompositionsreaktion mellem et ferrisalt og en base. Passende ferrisalte omfatter ferrichlorid, ferrinitrat, ferriperchlorat, ferritrichloracetat, ferriammoniumacetat, ferricitrat, ferriammoniumcitrat og ferrioxysalte. Passende baser omfatter natriumhydroxid, natriumcarbonat, kaliumhydroxid, kaliumcarbonat, ammoniumhydroxid, ammoniumcarbonat etc.

Ved en foretrukken fremgangsmåde til kompleksdannelse af dextranderivatet med ferrihydroxid, dannes det kolloide ferrihydroxid delvis forud ved langsom partiel neutralisation af et ferrisalt med base, før reaktion med dextranderivatet finder sted, idet neutralisationen fuldendes i nærværelse af dextranderivatet. Herved fås de mest stabile produkter.

Når komplekset er fremstillet ved hjælp af delvis eller fuldstændig dannelse af ferrihydroxid in situ i nærværelse af dextranderivatet, vil den resulterende vandige opløsning af komplekset også indeholde et salt, der består af anionen fra ferrisaltet og kationen fra basen. Komplekset kan renses for denne urenhed enten ved, at man dialyserer opløsningen mod rindende vand, eller ved at man bundfælder komplekset ved tilsætning af et passende med vand blandbart opløsningsmiddel, som ikke opløser komplekset, såsom methyl- eller ethylalkohol, og derefter opløser komplekset igen i destilleret vand. Det er en fordel, at dette rensningsstrin ligner det, hvorunder dextranderivatet udvindes fra den reaktionsblanding, det

er dannet i. Det er derfor ikke nødvendigt at udvinde dextranderivatet fra dets reaktionsblanding, men reaktionsblandingen som sådan kan benyttes som udgangsmateriale ved fremstillingen af komplekserne med dextranderivatet.

Som antydnet i det foregående anvendes ferrihydroxid-dextrankomplekserne fremstillet ifølge opfindelsen især ved behandling af jernmangelanæmi.

Når dextranderivaterne benyttes til fremstilling af ferrihydroxid-dextrankomplekser til parenteral indgift, kan kompleksopløsningen behøve en smule yderligere behandling for at gøre dem mere egnede til sådant brug. Således kan det være nødvendigt at tilsætte passende mængder af stoffer, såsom glucose eller natriumchlorid, for at gøre opløsningerne i hovedsagen isotoniske. Det kan også være nødvendigt at indstille pH-værdien af jern-dextrankompleksopløsningen med en syre eller en base for at sikre sig, at den falder inden for området 5,5 til 8,5, fortrinsvis 5,5 til 7,0 og at lade opløsningen yderligere varmebehandle ved en forhøjet temperatur, for eksempel 50 til 130°C, fortrinsvis 90 til 120°C. En sådan yderligere varmebehandling kan bekvemt finde sted under autoklavering af produktet.

Det har vist sig, at det med jernkomplekser fremstillet af dextranderivater ifølge opfindelsen er muligt at opnå koncentrerede, stabile opløsninger. Med hensyn til giftighed kan for mus opnås en gennemsnits intravenøs LD₅₀-værdi, som er større end 2000 mg/kg. Komplekserne er stabile under oplagring og under sterilisation ved autoklavering, hvilket er standardmetoden til sterilisation af et produkt af denne art, selvom produktet naturligvis kan steriliseres ved andre metoder, for eksempel filtrering.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af følgende eksempel, hvor alle delangivelser er efter vægt, og N og M betyder normalitet og molaritet af opløsningerne.

Eksempel

300 dele dextran med lav molekylvægt, gennemsnitsmolekylvægt efter vægt 5.000, blev opløst i vand til en opløsning på 22,2 % vægt pr. volumen dextran. 10 N natriumhydroxidopløsning blev tilsat for at gøre opløsningen 1 N med hensyn til base, og opløsningen blev opvarmet til 60°C. Mere 10 N natriumhydroxid blev tilsat for at holde opløsningen 1 N, og temperaturen blev fastholdt på 60°C, indtil der ikke blev optaget mere natriumhydroxid.

Den basiske nedbrydningsblanding blev dialyseret mod rindende vand i 16 timer, hvorefter opløsningens pH var faldet til ca. 8. Det rå alkalibehandlede dextran blev så bundfældet fra opløsningen ved tilsætning af ethanol. 200 dele af det bundfældede dextran blev opløst i 700 dele vand, og opløsningen blev sendt ned gennem en søjle, 50 x 10 cm, af D.E.A.E. - cellulose, der var omdannet til acetatform ved successiv udvaskning med 0,5 M kaliumacetat og vand. Søjlen

blev så langsomt udvasket med vand, indtil eluatet var rensat for ethvert kulhydrat, hvilket blev bestemt ved måling af den optiske rotation af eluatet. Det af vaskevandet udvundne stoffe viste sig at være uændret dextran.

Søjlen blev derpå elueret med 10 M kaliumacetat, indtil kulhydratet var fuldstændig elueret. Dextranderivatet, i form af dets kaliumsalt, blev udvundet af eluatet ved bundfældning med vandig ethanol og viste sig at udgøre ca. 80% af det oprindelige basiske, nedbrudte dextran.

Dette stof blev derefter benyttet ved bundfældning af et ferrihydroxid-dextranderivatkompleks, som det beskrives i det følgende.

Natriumcarbonatopløsning, 120 rumfang af en 30% vægt pr. volumen opløsning, blev langsomt over 3 timer under konstant omrøring sat til en opløsning af ferrichlorid i vand, 50,4 dele i 159 rumfang vand. Temperaturen af blandingen blev hele tiden holdt på 30°C. Opløsningens pH ved tilsætningens slutning var 1,55. En vandig opløsning af dextranderivatet fremstillet som beskrevet i det foregående, 104 rumfang af en 20,5% vægt pr. volumen opløsning, blev så tilsat på lignende måde over 1,5 time. Natriumcarbonatopløsning, 75 rumfang af en 16% opløsning, blev derpå tilsat for at bringe pH af den endelige opløsning op på 4,3.

Ferrihydroxid-dextranderivatkomplekset blev udfældet ved tilsætning af ethanol, 1000 rumfang, og bundfældet blev opsamlet ved centrifugering. Efter udvaskning 3 gange med 60% ethanol, blev bundfældet opløst i destilleret vand, 500 rumfang, og pH indstillet på 6,0 ved tilsætning af natriumhydroxidopløsning, 12 rumfang af en 10% opløsning. Opløsningen blev varmebehandlet ved 90°C i 2 timer, idet pH blev holdt på 5,9-6,0 ved tilsætning af flere portioner base.

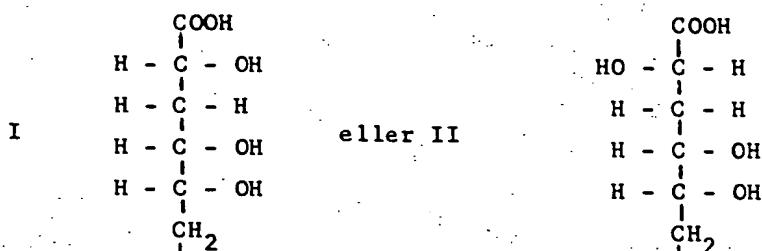
Opløsningen blev koncentreret i vakuum og ved 45°C til 100 rumfang, filtreret og derpå autoklaveret i 30 minutter.

Produktet havde en slut-pH-værdi på 6,1. Jernindholdet var 15,4%, og det totale indhold af fast stof var 46,2%. LD₅₀-værdien for mus var ikke under 2500 mg Fe/kg.

Når produktet blev indsprøjtet intramuskulært i bagbenet af en kanin i en dosis på 40 mg Fe pr. kg, var mindre end 20% af jernet tilbage ved injektionsstedet efter 7 dage.

P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af et ferrihydroxid-dextranderivatkompleks eller en opløsning deraf, ved omsætning af et dextranderivat med kolloid ferrihydroxid ved forhøjet temperatur, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et dextranderivat, hvor de polymere kæder har mindst én endestillet enhed med strukturformlen:



eller et salt eller en lakton deraf, afledet af en dextran, hvis gennemsnitsmolekylvægt efter vægt er højst 50.000, hvorefter det dannede kompleks eventuelt udvindes.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at i det mindste en del af det kolloide ferrihydroxid er blevet fremstillet forud ved langsom partiel neutralisation af en opløsning af et ferrisalt med en base, og at neutralisationen afsluttes i nærværelse af dextranderivatet.

Fremdragne publikationer:

Danske patentansøgninger nr. 5247/67, 3415/68 (patent nr. 122398)
 USA patenter nr. 3022221, 3151107, 3234209.